Laboratorio di Patologia Generale
del R. Istituto di Studi Superiori pratici e di perfezionamento in Firenze
diretto dal Prof. A. LUSTIG

RICERCHE

SUI

FENOMENI DELL'IMMUNITÀ

IN ALCUNI VERTEBRATI INFERIORI

DEL

DOTT. GINO GALEOTTI

FIRENZE
STABILIMENTO TIPOGRAFICO FIORENTINO
Via San Gallo, 33

1898

Laboratorio di Patologia Generale del R. Istituto di Studi Superiori in Firenze
diretto dal prof. A. Lustig.

RICERCHE SUI FENOMENI DELL' IMMUNITÀ

IN ALCUNI VERTEBRATI INFERIORI

DEL

DOTT. GINO GALEOTTI.

Mentre eseguivo una serie di ricerche sopra alcune tartarughe palustri, si sviluppò tra esse una epidemia e in pochi giorni tutte andarono a morire. Il dott. Polverini isolò dal sangue di questi animali un microrganismo, di cui le proprietà biologiche in parte collimano con quelle del B. ranicida dell'Ernest. Però questo autore non dà del bacterio da lui trovato una descrizione sufficientemente particolareggiata, quindi non si potè decidere in modo assoluto se questo vada identificato o no col ranicida. (1)

La sua proprietà più importante è quella di essere eminentemente patogeno per moltissimi animali a sangue freddo, mentre non lo è punto per i mammiferi e per gli uccelli. Questo ultimo fatto si spiega benissimo, perchè il microrganismo non si sviluppa a 37°. (2)

Non mi occuperò a descrivere i caratteri biologici di esso, poichè non hanno invero alcuna importanza; dirò solo che cresce benissimo su tutti i terreni di cultura, vegeta abbondantemente sulle patate, fluidifica la gelatina.

I caratteri microscopici sono: bacillo corto, tozzo, ad estre-

(1) Nonostante ciò, per comodo di esposizione, seguiterò a dare il nome di *b. ranicida* al microrganismo da me adoperato nelle seguenti esperienze.

(2) Per questo e per il modo con cui si sviluppa sulle patate questo microrganismo differisce essenzialmente dall' *Hydrophylus fuscus* di Sanarelli.

mità arrotodate, un po' ristretto nel mezzo, sembra circondato da una capsula; somiglia assai a quello della peste bubbonica.

Pensai di utilizzare questo microrganismo per uno studio di indole generale sulla immunità; volli cioè con esso eseguire una serie di esperienze, destinate a ricercare alcune delle modalità, con cui il meccanismo della immunità si esplica. Il fenomeno della immunità è certamente molto complesso, e, per studiarlo praticamente, bisogna preferire quelle condizioni, in cui si può pensare che esso vada svolgendosi in un modo più semplice.

Come dirò in seguito, nel caso presente, queste condizioni di maggior semplicità si verificano, mancando nella sindrome morbosa dell' infezione il momento tossico, mancando localizzazioni speciali negli organi più importanti.

Da altra parte i vertebrati inferiori, poco usati fin qui per lo studio delle malattie infettive, si prestavano assai al mio scopo per la loro resistenza in generale ai processi di immunizzazione e specialmente per la capacità che hanno le cellule dei loro organi a restar viventi per parecchio tempo, anche dopo che gli organi furono separati dall'animale, fatto questo che è p. es. all'evidenza dimostrato dagli epiteli vibratili.

Esperimentai su molti animali a sangue freddo, e specialmente usai le salamandre, i rospi, le rane e le tartarughe.

Praticai generalmente le infezioni, iniettando nella cavità peritoneale una goccia o due di emulsione, in acqua distillata, di coltura in agar. In questo modo si ha una malattia assai rapidamente mortale. Ma del resto basta semplicemente scalfire l' epidermide e passare sopra la lesione con l'ago di platino, carico di bacteri, per produrre l' infezione. Moltissime salamandre ammalarono e morirono spontaneamente, solo per essere state messe in vasi, in cui avevo in precedenza tenuto animali infettati. La malattia decorre assai più rapidamente se la temperatura dell'ambiente è tra 18° e 20°, ed allora la morte può avvenire in circa 12 ore. Per questo, in tutte le mie esperienze, ho sempre tenuto gli animali indistintamente entro un termostato a 20°.

Le salamandre morte per infezione appaiono assai edematose. Alla sezione si trova sempre un abbondante essudato pe-

ritoneale, ricchissimo di leucociti e di bacilli. I visceri appaiono normali, soltanto il fegato è un po' ingrossato e diventato più scuro e la milza raggiunge un volume che è 2, 3 e 4 volte maggiore di quello normale.

L'esame microscopico del sangue dimostra che si tratta in ogni caso di una vera setticemia. I bacilli si trovano abbondantissimi nel plasma. Ogni leucocito è carico di bacteri, i quali sono in parte in via di distruzione; questi fenomeni fagocitarî sono specialmente notevoli negli elementi fissi della milza. Col sangue i bacteri arrivano in tutti gli organi, ed in tutti questi si possono ritrovare, sia dentro i vasi, sia, fuoriusciti da questi, nei fasci connettivali e negli interstizi cellulari, proprio in contatto con le cellule dei parenchimi.

Ho fatto una serie di ricerche, destinate a rintracciare se esistessero alterazioni cellulari sebbene delicatissime, nelle varie cellule di animali morti dopo circa 12 ore di malattia e di cui i vari organi erano fissati immediatamente appresso la morte. Usai a tale scopo i diversi metodi citologici. Presi specialmente in considerazione il sistema nervoso centrale, il cuore, il fegato, la milza, i reni, l'intestino e il sangue.

Nella milza l'aumento di volume era solo determinato da un maggiore afflusso di elementi del sangue: in essa verificai però aumento nella distruzione dei corpuscoli rossi. Nel sangue trovai un maggior numero di corpuscoli rossi in via di vacuolizzazione e numerosi leucociti con nucleo in incipiente cromatolisi. Ma negli altri organi non trovai alterazioni cellulari di nessuna specie, e gli organi studiati non differivano da quelli normali. [1]

Quale è dunque la causa della morte dell'animale?

Da principio naturalmente pensai che in questa infezione predominasse un momento tossico e che la morte fosse la conseguenza di una grave, acuta intossicazione, e quindi feci al-

---

[1] Se però la malattia ha durato più di 12 ore (cioè da 18 a 24) allora incominciano ad apparire alterazioni e specialmente: rigonfiamento delle cellule, comparsa in esse di punti ialini e talvolta anche dei veri disfacimenti necrotici. Quanto più ha durato la malattia tanto più sono a luogo a luogo notevoli queste alterazioni.

cune esperienze destinate a mettere in evidenza questo principio tossico, che cominciai a ricercare nelle colture.

Filtrai dapprima delle culture in brodo di 10 e di 20 giorni provenienti dal bacillo virulentissimo, ed iniettai in salamandre e rane il filtrato, completamente privó di bacteri, (in quantità variabili da 1 a 2 cm.). Alcuni di questi animali morirono dopo 3, 4, 5 giorni, mostrando un grave edema diffuso, però mi convinsi ben presto che l' intossicazione prodotta era semplicemente dovuta al peptone e al cloruro di sodio contenuto nel liquido culturale.

Piccole quantità di filtrato non ebbero alcuno effetto, mentre è noto che in generale le tossine bacteriche agiscono anche in dosi piccolissime.

Cercai allora un liquido culturale privo di peptoni e di ClNa ed assai utile mi riuscì una soluzione di caseina (in acqua alcalinizzata con carbonato sodico). In questo terreno di cultura, che ho poi adoperato assai frequentemente per diverse esperienze, il bacillo da me studiato si sviluppa benissimo. [1]

Filtrai alcune culture fatte in tale liquido e di 10, 20, 30 giorni di età ed iniettai il filtrato in salamandre e rane nella quantità di $^1/_2$ a 1 $^1/_2$ cmc. per le salamandre e di 1-3 cmc. per le rane. *Nessuno degli animali morì.*

Pensai quindi che potessero esser tossici i corpi dei bacteri stessi o meglio le sostanze in essi contenute. Iniettai quindi in altre salamandre e rane delle emulsioni di bacteri sviluppatisi sull'agar od uccisi col riscaldamento a 45°-50°. In nessun caso ebbi la morte degli animali. Esperimentai anche delle soluzioni di un nucleoproteide che, come dirò in seguito, estrassi dai corpi dei bacteri. In questo caso ebbi i seguenti resultati.

---

[1] Preparai da me stesso la caseina nel modo seguente. Prendevo una quantità determinata di siero di latte (latte spannato) e ne precipitavo la caseina, acidificando con acido acetico. Discioglievo il precipitato raccolto con soluzione di idrato sodico e precipitavo nuovamente con acido acetico. Lavavo quindi il precipitato con molta acqua e lo sbattevo poi con alcool prima ed etere poi. La sostanza secca veniva finalmente disciolta in tanta soluzione di carbonato sodico da ritornare al volume primitivo del latte. Sterilizzavo poi tale soluzione a 100° per tre volte.

I microrganismi coltivati nella soluzione di caseina conservano la loro completa virulenza.

Dopo l'iniezione di piccole quantità, gli animali non presentarono alterazioni; iniettando invece grandi dosi, sia sottocute, sia nel peritoneo, le salamandre e le rane morirono dopo 3-5 giorni, la sezione e l'esame microscopico mi rivelarono la presenza di focolai di necrosi da coagulazione a cui probabilmente era dovuta la morte tardiva degli animali. In nessun caso ebbi la morte in 12 ore come avviene nella infezione.

Mi sembra adunque per tutto ciò dimostrato che non esistono principi tossici per gli animali soggetti alla infezione, nè nei liquidi culturali, nè nel corpo del bacillo da me studiato.

Finalmente volli provare se fosse il caso, che si potessero produrre sostanze tossiche nell'organismo stesso degli animali infettati, per l'azione dei microrganismi sugli elementi cellulari e sui succhi organici. A tale scopo feci l'infuso in acqua distillata, contenente disciolta una traccia di Cl Na, di visceri e muscoli di rane e salamandre morte per infezione (una parte in peso di tessuti e 4 di liquido), filtrai il liquido attraverso la candela di Chamberland, e lo iniettai in altre salamandre normali nella quantità di $^1/_2$-1 $^1/_2$ cmc. Ripetei analoghe esperienze per le rane (la quantità del liquido iniettato fu in questo secondo caso di 1-3 cmc.). Non ebbi mai la morte dell'animale.

Mi sembra adunque di poter concludere che la morte degli animali infettati non avviene in conseguenza di una intossicazione.

Quale dunque è la causa della morte, giacchè, mancando, come sopra ho detto ogni alterazione morfologica, non si può ammettere neppure una qualche azione meccanica dei microrganismi sulle cellule dei tessuti, o su qualche organo indispensabile alla vita?

È certo che in questo caso i protoplasmi cellulari di molti organi parenchimatosi (e presumibilmente i protoplasmi di quelle cellule che sono dotate di una minore energia di resistenza contro gli elementi deleteri dell'ambiente e che si vedono per le prime soccombere dinanzi ad essi) muoiono rapidamente per dato e fatto della vicinanza di questi microrganismi patogeni. Ma quali sono i mezzi con cui i microrganismi uccidono così presto le cellule?

A questo importantissimo problema, che non ha ancora mai avuto una soluzione generale, rivolsi da principio le mie ricerche, poichè mi sembrava di essere in condizioni favorevoli per la sua trattazione, ma non potei giungere ad alcuna conclusione definitiva.

I. — Esperienze sulla immunità

Sostanze capaci di conferire l' immunità alle salamandre ed alle rane.

Feci numerose esperienze su rane, su salamandre e su rospi allo scopo di conferire ad essi l' immunità. Di queste ne riporterò alcune come le ho estratte dal mio protocollo.

1. — Esperienze con cultura e con batteri uccisi mediante il calore.

Animale	Qualità del vaccino iniettato	Quantità del vaccino iniettato	Quantità della emulsione di bacilli virulenti iniettati	Giorni intercorsi tra la vaccinaz. e la infezione	Resultato
Salamandra	Coltura in brodo riscaldato a 100° per 10 minuti.	$^1/_2$ cmc. in 1 volta	$^1/_{10}$ di cmc	3	Muore
Salamandra	Idem.	$^1/_4$ cmc. in 2 gior.	$^1/_{10}$ di cmc	4	Muore
Salamandra	Idem.	$^1/_2$ cmc. in 3 gior.	$^1/_{10}$ di cmc	3	Muore
Rana	Idem.	$^1/_2$ cmc. in 1 volta	$^1/_3$ di cmc	3	Muore
Rana	Idem.	$^1/_2$ cmc. in 3 gior.	$^1/_3$ di cmc	4	Muore
Salamandra	Coltura in brodo riscaldato a 50° per mezz' ora.	$^1/_3$ cmc. in 1 volta	$^1/_{10}$ di cmc	3	Muore
Rana	Idem.	$^1/_2$ cmc. in 2 volte	$^1/_3$ di cmc	3	Muore

Animale	Qualità del vaccino iniettato	Quantità del vaccino iniettato	Quantità della emulsione di bacilli virulenti iniettati	Giorni intercorsi tra la vaccinaz. e la infezione	Resultato
Salamandra	Emulsione di bacteri sviluppatisi in agar e riscaldati a 50° per mezz' ora.	1/2 cmc. in 3 volte	1/10 di cmc	4	Muore
Salamandra	Idem.	1/2 cmc. in 2 gior.	1/10 di cmc	3	Vive, ma resta edematosa per molto tempo.
Rana	Idem.	1 cmc. in 1 volta	1/3 di cmc	4	Muore
Rana	Idem.	1 cmc. in 3 gior.	1/3 di cmc	4	Vive
4 Rospi	Cultura in soluzione di caseina riscaldata a 50° per 1/2 ora.	1 cmc. per uno in 1 volta	1/3 di cmc	6	Vivono
Salamandra	Filtrato di una cultura in brodo di 15 giorni.	1/2 cmc. in 1 volta	1/10 di cmc	3	Muore
Salamandra	Idem.	1/2 cmc. in 2 gior.	1/10 di cmc	3	Muore
3 Salamandre	Idem.	1/10 cmc. per gior. per 4 gior. alternan.	1/10 di cmc	6	Vivono
2 Rane	Filtrato di una cultura in brodo di 15 giorni.	1/4 di cmc in 2 gior.	1/3 di cmc	6	Vivono
2 Rane	Idem.	1/2 cmc. in 1 volta 1/3 nel giorno successiv.	1/3 di cmc	6	Muoiono
Salamandra	Filtrato di una cultura in soluzione di caseina di 20 giorni di età.	1/3 di cmc in 1 volta	1/10 di cmc	3	Vive

Animale	Qualità del vaccino iniettato	Quantità del vaccino iniettato	Quantità della emulsione di bacilli virulenti iniettati	Giorni intercorsi tra la vaccinaz. e la infezione	Resultato
2 Salamandre	Idem.	1/4 di cmc p. giorno per 2 gior.	1/10 di cmc	4	Vivono
2 Salamandre	Idem.	1/5 di cmc p. giorno per 3 gior.	1/10 di cmc	4	Vivono
3 Tartarughe	Idem	1/3 di cmc p. giorno per 3 gior.	1/3 di cmc	6	Vivono
2 Tartarughe	Idem.	1 cmc per una in 1 volta	1/2 cmc	8	Vivono

Da queste esperienze risulta che non furono atte a conferire le immunità nè le culture in brodo, nè i corpi dei bacteri riscaldati a 50° o 60°. Che i filtrati della cultura in brodo posseggano un certo potere vaccinale, il quale però generalmente è sopraffatto dalla tossicità delle sostanze contenute nel brodo per cui gli animali si indeboliscono e non possono reagire contro la infezione.

Il filtrato della cultura in soluzione di caseina si dimostrò invece sempre efficace.

Tentativi di isolamento delle sostanze vaccinanti contenute nei liquidi culturali o nei bacteri

A). — Cultura in brodo di un mese d' età.

Si filtra con candela di Chamberland.

Liquido leggermente alcalino. Acidificandone una porzione non si ha notevole intorbidamento.

1° Ne saturo una metà con solfato magnesico. Si forma un leggero precipitato fioccoso che vien raccolto su filtro, la-

vato con soluzione satura di solfato magnesico, sciolto in acqua leggermente alcalina e dializzato. Questa sostanza è *efficace* per produrre la immunità anche se iniettata in quantità piccolissima.

2° Nel filtrato ottenuto dopo la saturazione con solfato magnesico sciolgo a saturazione (temp. 18°) del solfato sodico. Il precipitato lavato, ridisciolto e dializzato è pure *efficace*.

3° La seconda porzione viene saturata con solfato ammonico. Il precipitato convenientemente trattato si mostra pure *efficace*.

Da altri filtrati, pure di culture in brodo, ottenni gli estratti alcoolici ed eterici. Essi si mostrarono inefficaci in ogni caso. Così pure risultarono inefficaci le sostanze estratte dalle culture in brodo mediante l'acetato di piombo e il cloruro di zinco.

B). — Sostanze estratte dal filtrato di una cultura in soluzione di caseina di 20 giorni di età.

Acidifico con acido cloridrico diluitissimo. Ottengo un:

1° Precipitato bianco fioccoso. Lavo abbondantemente con acqua acidulata e poi con acqua distillata. Disciolgo poi il precipitato in soluzione di carbonato di soda. Questo liquido ha *notevoli proprietà immunizzanti.*

2° Precipito di nuovo con acido cloridrico. Il precipitato, che ha sempre l'aspetto della caseina, convenientemente lavato e disciolto è *efficace*. Il filtrato (neutralizzato) è invece *inefficace*.

3° Ripeto lo stesso processo. Il precipitato di caseina è ancora *efficace*.

4° Il filtrato ottenuto dopo la prima acidificazione si mostra (dopo la neutralizzazione) anche *efficace*. *Efficaci* pure si dimostrano le sostanze che da esso vennero estratte mediante la saturazione con solfato magnesico o sodico.

C). — Dal corpo dei bacteri estrassi poi un nucleo-proteide dotato di grandissime proprietà vaccinali. Coltivai i bacilli su patate, raschiai le colonie e sciolsi i bacilli in poca soluzione di potassa all' 1 °/₀. Trattai quindi la sostanza con acqua acidulata con acido acetico ed ottenni un precipitato fioccoso, che raccolsi su filtro, lavai, ridisciolsi in soluzione alcalina e purificai quindi con una nuova precipitazione. La sostanza così ottenuta, disciolta di nuovo in soluzione di carbonato di soda, *conferì*

l' immunità alle salamandre, alle rane ed alle tartarughe anche se iniettata in quantità piccolissima. Essa fu da me sempre usata in seguito per la immunizzazione degli animali destinati ad altre esperienze ed alla produzione del siero. Mostrò le proprietà chimiche dei *nucleo-proteidi.* (1)

D). Anche mediante il siero di animali vaccinati potei produrre l'immunità. Fu necessario però di usare il siero di animali della stessa specie giacchè invece col siero, anche immunizzante di animali di altra specie in grazia della azione tossica che il siero di una specie di anfibi esercita probabilmente sopra anfibi di altra specie, l' immunità non veniva raggiunta. Ciò mi fu dimostrato da numerose esperienze, di cui riporto le seguenti.

Animale da cui fu estratto il siero	Sostanza adoperata per l'immunizzazione	Animali a cui fu iniettato il siero a scopo vaccinale	Quantità del siero iniettato	Quantità della emulsione infettante iniettata	Resultato
Salamandra	Filtrato di una cultura in soluzione di caseina.	2 Salamandre.	1/10 di cmc per animale.	1/10 di cmc	Non ammalano.
Salamandra	Nucleo-proteide.	Salamandra	1/10 di cmc	1/10 di cmc	Non ammala.
Salamandra	Idem.	Rana.	1/5 di cmc	1/3 di cmc	Muore.
Tartaruga.	Idem.	Salamandra	3/10 di cmc	1/10 di cmc	Muore in 24 ore.
Tartaruga.	Idem.	Tartaruga.	1/2 cmc	1/3 di cmc	Non ammala.
Tartaruga.	Idem.	Rana.	1/2 cmc	1/3 di cmc	Muore in 24 ore.

N.B. — La infezione degli animali vaccinati fu fatta sempre 24 ore dopo l' iniezione del siero. Il sangue fu estratto dall'animale mediante decapitazione o dal cuore e se ne separò il siero centrifugandolo.

(1) Riguardo ai nucleo-proteidi dotati di proprietà immunizzanti ed alle particolarità del metodo usato per estrarli, cfr. GALEOTTI, *Contributo allo studio dei nucleo-proteidi bacterici.* (*Il Morgagni*, 1898).

Per ultimo cercai se, mediante l'iniezione di altri microrganismi, non patogeni per le salamandre, si poteva a queste conferire la immunità verso il bacillo da me studiato. Feci quindi le seguenti esperienze:

Animali	Quantità e qualità della cultura iniettata	Quantità della emulsione infettante iniettata	Resultato
2 Salamandre	$^1/_3$ cmc. di emulsione di cultura in agar di *B. fluorescens putridus.*	$^1/_{10}$	Morte in 18 ore.
2 Salamandre	$^1/_2$ cmc. di emulsione di cultura in agar di *B. mesentericus.*	$^1/_{10}$	Morte in 18 ore.
2 Salamandre	$^1/_2$ cmc. di emulsione di cultura in agar di *Stafilococco piogeno.*	$^1/_{10}$	Una morì in 24 e l'altra in 36 ore.

N.B. — L'infezione fu in ogni caso fatta tre giorni dopo la iniezione preventiva.

Resulta adunque che altri microrganismi, non patogeni per le salamandre, non sono capaci d'immunizzare le salamandre contro il *b. ranicida*.

II. — Sul meccanismo della immunità.

Ho voluto tentare anche in questo caso la solita questione fondamentale di tutto il problema della immunità. Con quale meccanismo vengono uccisi i bacteri nell'organismo dell'animale immunizzato? Ed inoltre: il processo di distruzione avviene nel modo stesso come nel caso, in cui siano introdotti microrganismi non patogeni in un animale normale? Per questo ho fatto sempre una doppia serie di esperienze: da una parte usavo tartarughe immunizzate e *b. ranicida* completamente virulento, da l'altra animali normali e microrganismi non patogeni per essi come il *b. coli* e il *b. fluorescens putridus*. Per essere più sicuro della

immunità usavo animali che, oltre l'immunizzazione, avevano subìto la infezione di prova e non si erano affatto ammalati.

Possiede il siero di tartarughe normali un potere bactericida?

A questo proposito riporto alcune delle esperienze fatte.

Esse vennero così eseguite. Il sangue, estratto dal cuore fu subito centrifugato. Aspirai il siero limpido, *privo di leucociti*, con una sottile pipetta e lo versai in una capsolina di vetro sterilizzata. In esso infusi i microrganismi, che avevo raccolto con la punta di un ago di platino da una cultura in agar. A differenti intervalli di tempo immergevo nel siero così innestato una lunghezza determinata di ago di platino e con questo facevo delle piastre mediante una miscela a parti eguali di agar e gelatina. Dopo 24 ore (temp. 20°) contavo le colonie sviluppate in ogni piastra.

	Numero delle colonie sviluppatesi sulle piastre fatte dopo					
	0 ore	2 ore	4 ore	8 ore	12 ore	24 ore
Siero di tartarughe vaccinate e *B. ranicula* virulento	63	54	152	588	1042	∞
	42	39	120	436	—	—
	21	20	98	324	912	∞
	56	25	104	497	—	—
	15	22	163	—	∞ (1)	—
Siero di tartaruga normale e *B. ranicula* virulento	22	43	175	303	1121	∞
	22	15	197	948	∞	—
	80	57	221	565	—	—
Siero di tartaruga normale e *Bact. coli*	76	68	125	342	—	—
	19	23	87	115	406	—
Siero di tartaruga normale e *B. fluor. putr.*	10	21	248	—	—	—
	38	25	164	216	932	∞

Come si vede dalla tabella precedente, in tutte queste esperienze ebbi un somigliante risultato in ogni caso; che cioè entro

(1) Quando fu possibile furono contate tutte le colonie sviluppatesi sopra le piastre. Altrimenti furono contate solo quelle che si trovavano in un quadrante della scatola. Il segno ∞ significa che le colonie erano tante che era impossibile contarle.

le prime due ore i microrganismi infusi nel siero diminuiscono o per lo meno non aumentano e che nelle ore successive vanno sempre aumentando con notevole progressione.

Ciò avviene tanto nel siero di animali immunizzati quanto nel siero di animali normali e per tutte le tre specie di microrganismi che io ho adoperato.

Debbo dunque escludere ogni azione microbicida in vitro del siero di sangue tanto se esso è dotato di proprietà immunizzanti quanto se non lo è.

Esperienze sulla fagocitosi.

Feci anche alcune esperienze per vedere quale importanza avesse la fagocitosi nella distruzione dei microrganismi.

Studiai dapprima come avveniva la fagocitosi in vitro col seguente semplicissimo metodo.

Iniettai nel peritoneo di salamandre immunizzate o no una miscela a parti eguali di siero di salamandra normale e di soluzione fisiologica di cloruro di sodio in quantità di 1|2 cmc. Lasciando in riposo per qualche ora le salamandre così iniettate e poi aspirando di nuovo il liquido, si trova che esso è carico di leucociti stravasati. Distribuivo delle piccole goccie di questo liquido sopra alcuni vetrini coprioggetti; innestavo le goccie toccandole con un ago di platino sottilissimo, bagnato in una emulsione di microrganismi, rovesciavo i vetrini su porta oggetti da goccia pendente e ne facevo la osservazione microscopica a differenti intervalli. In due casi ho anche fatto il conteggio dei microrganismi mediante le lastre, innestando alla fine della osservazione microscopica i terreni culturali con la punta di un ago immersa nella goccia pendente.

I. — *Leucociti provenienti da salamandre immunizzate.*

Oss. dopo 2 ore. — Tutti i leucociti sono carichi di bacilli. Si vedono ancora molti bacteri liberi. Nella lastra si sviluppano 230 colonie.

Oss. dopo 6 ore. — I leucociti sono sempre carichi di bacilli, alcuni di questi son ridotti a granuli. Molti microrganismi liberi. Nella lastra colonie 204.

Oss. dopo 12 ore. — Quasi tutti i bacilli sono stati inglobati, poichè soltanto raramente se ne vedono alcuni liberi. Colonie N. 63.

Oss. dopo 17 ore. — Non si vedono più bacilli liberi. Entro i fagociti molti bacilli sono ridotti a piccoli granuli. Colonie N. 4.

Oss. dopo 24 ore. — Alcuni leucociti cominciano a disgregarsi e si vedono qua e là nel campo microscopico dei frammenti protoplasmatici di forma irregolare; di questi alcuni, assai refrangenti, sembrano derivare dai corpi bacterici già digeriti da leucociti poi disgregati, altri, meno refrangenti, provengono dal corpo cellulare dei leucociti stessi. Si vedono anche alcuni nuclei di leucociti isolati. Colonie N. 5.

Oss. dopo 48 ore. — Non si vedono bacilli intieri liberi. Leucociti in via di disgregazione. Altri, ancora intieri, mostrano nel loro citoplasma numerose granulazioni, residui dei bacilli digeriti. Colonie N. 5.

2. — *Leucociti provenienti da salamandre normali* (*non immunizzate*).

Oss. dopo 2 ore. — Leucociti carichi di bacilli. Molti bacteri liberi. Sulla lastra si sviluppano 198 colonie.

Oss. dopo 6 ore. — Il processo di fagocitosi prosegue, giacchè tutti i leucociti sono carichi di bacteri. Molti bacilli liberi. Colonie N. 347.

Oss. dopo 12 ore. — Nei fagociti si comincia a verificare la digestione dei bacteri inglobati. Si vedono ancora alcuni bacteri liberi. Colonie N. 201.

Oss. dopo 17 ore. — Si vedono ancora molti bacteri liberi. Nei leucociti cominciano a verificarsi fatti di degenerazione e disgregazione. Colonie N. 143.

Oss. dopo 24 ore. — Molti leucociti sono disgregati. Il campo del microscopio è pieno di granulazioni protoplasmatiche e di bacteri intieri. Colonie N. 28'.

Oss. dopo 48 ore. — Gli stessi fatti. Si vedono ancora dei fagociti sani carichi di bacteri deformati. Nella lastra un gran numero di colonie che non riesco a contare.

Comparando queste due esperienze fra loro e altre che ho fatto nello stesso modo e che mi hanno dato risultati concordanti, posso concludere: che la fagocitosi e la distruzione intracellulare dei bacteri avviene in vetro tanto se i leucociti provengono da salamandre immunizzate, tanto se essi appartenevano a salamandre non preparate — che i leucociti immunizzati hanno un potere assai maggiore per distruggere i bacteri virulenti, e che questi bacteri non si sviluppano nel liquido

che contiene tali leucociti, mentre essi seguitano a moltiplicarsi in presenza di leucociti provenienti da salamandre non trattate — che i fagociti che hanno inglobato bacteri virulenti, se provengono da salamandre immunizzate, si disgregano più tardi di quelli che appartenevano a salamandre normali.

*
* *

Altre esperienze furono destinate a studiare la fagocitosi come avviene nella cavità peritoneale delle salamandre. A questo scopo iniettavo ora in salamandre vaccinate, ora in salamandre normali emulsioni di *b. ranicida* virulenti, di *b. coli* e di *b. fluorescens putridus* e poi a differenti intervalli di tempo osservavo il liquido peritoneale in goccia pendente (aggiungendo talvolta alla goccia un granello di *bleu* di metilene) o in preparati a secco.

Sembrandomi inutile di riferire dettagliatamente queste esperienze, verrò ai loro resultati, i quali concordano con quelli ora enunciati. Cioè potei osservare: che in ogni caso i leucociti conservano il potere di inglobare i bacteri e di distruggerli (o almeno di distruggerne alcuni) — che nella cavità peritoneale delle salamandre vaccinate e iniettate col *b. ranicida* virulento o delle salamandre normali iniettate col *b. ranicida* attenuato, o col *b. coli* la fagocitosi è più rapida, i fagociti presentano solo raramente fatti di degenerazione (in specie vacuolizzazione del nucleo) o di disgregazione — che in questo caso i microrganismi non si moltiplicano e dopo un certo tempo son completamente scomparsi e dal corpo cellulare dei leucociti e del liquido peritoneale — che invece nella cavità peritoneale di salamandre non preparate e iniettate col *b. ranicida* virulento la distruzione intracellulare dei bacteri è meno attiva, e i microrganismi si sviluppano rigogliosamente nel liquido peritoneale e rapidi e numerosi sono i fatti di disgregazione dei leucociti.

Finalmente volli vedere quanto tempo duravano i fenomeni di fagocitosi nella cavità peritoneale di salamandre immunizzate che avevano ricevuto iniezioni di *b. ranicida*, e di salamandre

normali iniettate con il *b. coli*, e che naturalmente non si erano ammalate.

Non ripeterò qui le esperienze fatte che consistevano nell' osservare, dopo diversi intervalli di tempo, il liquido peritonealale delle salamandre iniettate. Mi risultò che, dopo circa 6 giorni si vedevano ancora nel liquido peritoneale leucociti contenenti bacteri o residui di bacteri.

*
* *

Un' altra serie di esperienze fu destinata a studiare direttamente l' azione delle cellule di alcuni organi (fegato, rene, milza, muscoli) sopra bacteri patogeni o no. A questo scopo usai il seguente metodo: preparavo degli aghi di vetro sottilissimi e tutti di eguale calibro. Dopo averli lavati con acqua, alcool ed etere ed averli sterilizzati, ne immergevo la punta (per una lunghezza determinata e costante) in una emulsione in soluzione di ClNa dei bacteri che volevo sperimentare. Affinchè sugli aghi rimanesse sempre uno strato egualmente sottile di liquido praticavo così l' esperienza. Immergevo un'ansa di platino nella emulsione dei bacteri, disponendo quest' ansa carica di una goccia di questa soluzione ad una determinata distanza (circa 3 mill.) da un lastrina di vetro sterilizzata, e poi facevo passare la punta di ogni ago attraverso la goccia fino a che l' estremità dell' ago stesso toccasse la lastrina di vetro. Alcune esperienze preliminari mi dimostrarono (mediante il conteggio sulle lastre innestate con aghi egualmente immersi) che con questo metodo si riesce a caricare gli aghi di un numero pressochè costante di bacteri.

Poi infiggevo 8 o 10 di questi aghi infettati nel modo suddetto in ognuno degli organi isolati di tartaruga, conservando poi questi in una camera umida alla temp. di 14° - 16°. Dopo alcuni minuti mettevo uno di questi aghi in un tubo di agar-gelatina [1] e, dopo aver sbattuto accuratamente, versavo il con-

---

(1) Ho sempre usato una miscela a parti eguali della comune agar e di gelatina, affinchè la temperatura in cui il terreno nutritizio era ancora ben liquido non fosse superiore all' ottimo di temperatura del *b. ranicida*.

tenuto in una scatola di Petri. Ripetevo il processo con gli altri aghi dopo determinati intervalli di tempo, e, allorchè si erano sviluppate le colonie, procedevo al conteggio di esse.

Ho esperimentato sia con organi normali o immunizzati ancor *viventi* benchè separati dall'animale e con organi di cui le cellule erano state uccise mediante il congelamento. Ho preferito questo metodo per uccidere le cellule, giacchè ero sicuro di non alterare con esso le proprietà chimiche dei componenti cellulari e quindi di non distruggere le sostanze antibacteriche, dato che in quei tessuti ve ne fossero state.

Gli organi venivano congelati, appena estratti, ad una temperatura di circa — 10° e mantenuti a questa temp. durante 1[2 ora, poi li facevo rapidamente disgelare, mettendoli nel termestato a 37°. I muscoli così trattati diventavano, nel disgelarsi, assai trasparenti e si contraevano straordinariamente, poi si distendevano; perdevano anche del tutto la proprietà di contrarsi dietro convenienti stimoli elettrici.

Pezzetti di epitelio vibratile, egualmente trattati, perdevano, senza più racquistarlo, ogni movimento delle ciglia. Per queste e per altre ragioni, che ora sarebbe troppo lungo esporre, mi potei convincere della morte certa del protoplasma degli elementi congelati nel modo sopra descritto.

Quando ho potuto ho fatto ambedue le esperienze, con i tessuti normali cioè o con i congelati, servendomi dello stesso animale, di cui serbava un organo (rene o muscolo) o un pezzo di organo (fegato) intatto, mentre congelavo l'organo omologo o il resto dell'organo.

Nelle tabelle seguenti sono esposti i resultati delle esperienze fatte; alcune di queste sono state ripetute più volte ed ho avuto sempre resultati generalmente concordanti.

Esperienza I. — *B. ranicida* completamente virulento e organi di tartaruga normale.

(a)

	0 ore [1]	3 ore	6 ore	20 ore
Fegato..............	18	26	54	Moltissimi.
Rene................	24	89	126	Idem.
Milza...............	36	32	87	Idem.
Muscoli.............	15	41	320	Idem.

(b)

	0 ore	3 ore	6 ore	20 ore
Fegato..............	58	122	138	Moltissimi.
Rene................	83	122	290	Idem.
Milza...............	69	—	228	Idem.
Muscoli.............	71	215	181	Idem.

[1] Numero delle ore durante le quali gli aghi carichi di bacteri rimasero infissi nei vari tessuti di tartaruga.

Esperienza 2. — *B. ranicida* attenuato (per lunga permanenza sui terreni artificiali di cultura) e organi di tartaruga normale.

(a)

	0 ore		3 ore		6 ore		20 ore	
	Normale	Congel.	Normale	Congel.	Normale	Congel.	Normale	Congel.
Fegato........	84	150	10	168	2	231	2	—
Rene.........	119	72	4	77	8	—	2	—
Milza.........	91	66	7	—	2	320	9	—
Muscoli.......	76	92	4	68	0	69	—	724

(b)

	0 ore		3 ore		6 ore		20 ore	
	Normale	Congel.	Normale	Congel.	Normale	Congel.	Normale	Congel.
Fegato	42	13	15	128	68	210	16	∞
Rene.........	30	31	36	122	12	640	21	∞
Milza.........	28	43	42	92	2	115	74	Moltissimi.
Muscoli.......	39	22	4	215	45	127	7	∞

Esperienza 3. — *B. ranicida* completamente virulento e organi di tartaruga immunizzata.

(a)

	0 ore		3 ore		6 ore		20 ore	
	Normale	Congel.	Normale	Congel.	Normale	Congel.	Normale	Congel.
Fegato	98	105	54	123	13	232	21	Moltissimi.
Rene	83	72	—	—	22	—	2	Moltissimi.
Milza.........	44	36	15	54	8	124	6	Moltissimi.
Muscoli.......	76	41	29	36	72	50	19	Moltissimi.

(b)

	0 ore		3 ore		6 ore		20 ore	
	Normale	Congel.	Normale	Congel.	Normale	Congel.	Normale	Congel.
Fegato	23	42	42	73	21	416	15	Moltissimi.
Rene	67	80	4	118	18	119	3	Moltissimi.
Milza.........	107	99	26	25	13	—	2	Moltissimi.
Muscoli.......	96	102	34	31	12	327	—	Moltissimi.

Esperienza 4. — *Bacillus fluorescens putridus* e organi di tartaruga normale.

	0 ore		3 ore		6 ore		20 ore	
	Normale	Congel.	Normale	Congel.	Normale	Congel.	Normale	Congel.
Fegato	51	79	42	81	24	321	41	Moltissimi.
Rene	73	64	6	23	4	156	24	Moltissimi.
Milza	90	102	83	95	6	115	73	Moltissimi.
Muscoli	75	88	26	124	32	263	87	Moltissimi.

Esperienza 5. — *Bact. coli* e organi di tartaruga normale.

	0 ore		3 ore		6 ore		20 ore	
	Normale	Congel.	Normale	Congel.	Normale	Congel.	Normale	Congel.
Fegato	26	10	9	15	9	54	23	Moltissimi.
Rene	13	22	11	74	10	150	9	Moltissimi.
Milza	11	—	21	109	23	234	21	—
Muscoli	31	12	24	79	17	131	6	Moltissimi.

Da queste esperienze risulta:

1° Che le cellule di vari organi normali *viventi* sono capaci di uccidere i microrganismi non patogeni o i microrganismi patogeni attenuati;

2° Che le cellule *morte* (uccise mediante il congelamento) degli stessi organi non sono più capaci di uccidere gli stessi microrganismi, i quali anzi si sviluppano assai bene su esse;

3° Che le cellule, benchè *viventi*, non sono più capaci di uccidere il bacterio patogeno per esse, allorchè esso possiede tutte la sua virulenza: su esse il bacterio vegeta come un microrganismo non patogeno su cellule morte;

4° Che le cellule di organi appartenenti ad un animale immunizzato, si comportano di fronte al *b. rancida* virulento come le cellule di organi appartenenti ad un animale normale di fronte ad un microrganismo non patogeno; cioè son capaci di esercitare un' azione bactericida allorchè esse sono viventi, non sono più capaci di questa azione, dopochè vennero uccise mediante il congelamento.

Alcuni frammenti di visceri, nei quali erano restati infissi gli aghi di vetro per le precedenti esperienze, furono fissati in alcool, tagliati in serie e colorati con soluzione fenica di bleu di metilene e con soluzione alcoolica di eosina, metodo di colorazione che permette di studiare abbastanza bene il modo di comportarsi di certi microrganismi (che non resistono al metodo di Graam) nei tessuti. Malgrado le più accurate osservazioni microscopiche, non mi riuscì di sorprendere alcun fatto che mi spiegasse il modo con cui i microrganismi venivano distrutti nei tessuti. Potei osservare solo qualche fenomeno di fagocitosi per parte delle cellule linfoidi.

Aggiungerò ancora, riassumendo, che da queste esperienze resulta come il potere bactericida dei tessuti non sia da riferirsi alla presenza di sostanze capaci di uccidere i bacteri, giacchè i tessuti morti e non alterati chimicamente, non godono di un potere antibacterico, e come questo potere sia veramente una funzione *vitale* delle cellule, una proprietà cioè necessariamente collegata con la vita del protoplasma.

III. — Esperienze sulla azione del siero di sangue proveniente da animali immunizzati.

Poche parole dirò sul modo di produzione del siero. Gli animali venivano iniettati due o tre volte con piccola quantità di nucleo-proteide immunizzante; erano poi infettati e, dopo qualche giorno, estraevo il sangue dal cuore o mediante decapitazione, e lo centrifugavo per ottenere un siero limpido, privo di corpuscoli e di fibrina.

Ottenni così il siero dalle salamandre, dalle rane, dalle tar-

tarughe e dalle cavie, e sperimentai questi vari sieri su diversi animali, ricercando se essi avessero proprietà preventiva o curativa.

Riporterò alcune di queste esperienze:

Esperienze sull' azione preventiva.

Siero proveniente da	Iniettato in	Numero degli animali iniettati	Quantità del siero iniettato	Numero dei giorni dopo cui si praticò l' infezione intra-peritoneale	Resultato
Salamandra	Salamandre	3	$^2/_{10}$ cmc.	2 giorni	Non ammalano.
Tartaruga	Salamandre	3	$^1/_4$ cmc.	2 giorni	Muoiono tutti tre.
Tartaruga	Tartarughe	2	$^1/_2$ cmc.	3 giorni	Vivono tutti due.
Rana	Rane	2	$^1/_3$ cmc.	2 giorni	Vivono tutti due.
Cavia	Salamandre	3	$^1/_4$ cmc.	3 giorni	Muoiono.
Cavia	Rane	2	$^1/_3$ cmc.	2 giorni	Muoiono.

Esperienze sull' azione curativa.

Siero di	Iniettato in	Tempo intercorso tra l' infezione intra-peritoneale e l' iniezione di siero	Quantità del siero iniettato	Numero degli animali trattati	Resultato
Rana	Rana	2 ore	$^1/_3$ cmc.	3	Due vivono, una muore.
Rana	Rana	4 ore	$^1/_3$ cmc.	3	Due muoiono, una vive.
Tartaruga	Salamandra	2 ore	$^1/_3$ cmc.	3	Muoiono.
Tartaruga	Tartaruga	6 ore	1 cmc.	1	Vive.

Quattro rane furono iniettate ognuna con $^1/_3$ di cmc. di siero di sangue di rana immunizzata, in cui era stata stemperata un' ansa di cultura virulenta di *b. ranicida*. Nessuna di esse morì.

Da queste e da altre analoghe esperienze risulta:

che il siero di un animale immunizzato con la sostanza da me estratta dai corpi bacterici ha un' efficacia preventiva e curativa negli animali della stessa specie, mentre non ha efficacia su animali di specie differente. Questo fatto si può spiegare pensando all'azione tossica che probabilmente, nei vertebrati inferiori, il siero di animali appartenenti ad una specie esercita su animali appartenenti ad un'altra specie. L' attività di un siero, anche efficace, non si manifesta mai allorchè, per ragioni che sono insite nell'animale iniettato o che si riferiscono al siero stesso, le cellule dell'organismo trattato vengono ad essere in qualche modo offese o indebolite.

Furono infettati con emulsioni di microrganismi virulenti in siero di rana immunizzata:

3 rane che erano rimaste in laboratorio da circa tre mesi e che si trovavano in condizioni piuttosto cattive;

3 rane che 8 giorni prima erano state iniettate con $^1/_2$ cmc. di soluzione di ClNa all' 1 $^0/_0$;

2 rane che 8 giorni prima erano state iniettate con $^1/_2$ cmc. di soluzione di urea all' 1 $^0/_0$;

Tutte 8 queste rane morirono d'infezione.

L'azione del siero mi risultò incostante quando l'iniezione curativa veniva fatta da 3 a 4 ore dopo la infezione. Dopo un intervallo di tempo maggiore di 4 ore, il siero si mostrò inefficace. Tenendo conto della rapidità con cui si svolge questa infezione, si può comprendere come, dopo 4 ore, la energia di resistenza contro i bacteri delle cellule dell'organismo possa già aver subìto una diminuzione per causa della malattia sviluppatasi.

Volli poi studiare l' azione del siero direttamente sulle cellule dei soliti organi, per riguardo al comparire del potere bactericida, seguendo il metodo degli aghi che sopra ho descritti.

A questo scopo dopo essermi procurato del siero di tartaruga immunizzata, preparai la giugulare d' un' altra tartaruga

e iniettai nella vena stessa circa 1 cmc. del detto siero immunizzante. Dopo una mezz'ora uccisi la tartaruga e negli organi isolati di essa infissi i soliti aghi, bagnati in un'emulsione di bacilli virulenti. Ebbi contando le colonie sviluppatesi sulle piastre i seguenti resultati:

	0 ore	3 ore	6 ore	20 ore
Fegato	15	18	3	39
Rene.	20	16	12	—
Milza.	32	74	2	3
Muscoli.	17	9	—	18

Ripetei questa esperienza praticando la congelazione di uno dei reni, di un muscolo, d'un pezzo del fegato e d'una metà della milza, ed ebbi il resultato seguente:

	0 ore		3 ore		6 ore		20 ore	
	Normale	Congel.	Normale	Congel.	Normale	Congel.	Normale	Congel.
Fegato	70	72	83	94	24	115	3	Moltissimi.
Rene	56	65	25	77	82	262	—	Moltissimi.
Milza.	29	71	62	83	15	—	21	—
Muscoli.	62	48	31	120	9	301	16	Moltissimi.

Questi resultati, in confronto con quelli ottenuti in precedenti esperienze, sono ancora una conferma che il siero curativo non è capace per se stesso di uccidere i microrganismi (nè esercita in questo caso un'azione antitossica), che la uccisione di questi è direttamente opera degli elementi dei tessuti poichè il siero può in certi casi eccitare la cellula ad una attività bactericida.

Estratto dallo **Sperimentale** (*Archivio di Biologia*), anno LI, fasc. 4°.

Stab. Tip. Fiorentino, Via S. Gallo, 33, Firenze. – 1898